

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-23198

(43)公開日 平成5年(1993)2月2日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 12 Q 1/26  
1/30

識別記号  
C 12 Q 1/26  
1/30

序内整理番号  
6807-4B  
6807-4B

F 1

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全5頁)

(21)出願番号	特願平3-203212	(71)出願人 000224798 同和鉱業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号
(22)出願日	平成3年(1991)7月19日	(71)出願人 591057072 牧島 亮男 茨城県つくば市下広岡500-10

(71)出願人 591086706  
軽部 征夫  
神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地  
16  
(74)代理人 弁理士 丸岡 政彦

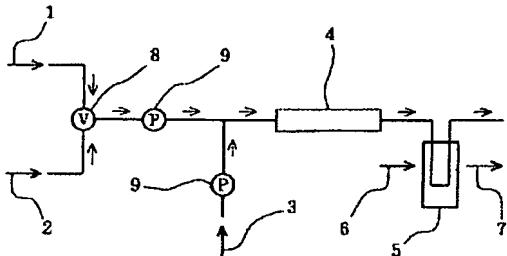
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微量水銀の連続測定方法

(57)【要約】

【目的】 極微量の水銀でさえも感度良く連続的に測定することができる微量水銀の連続測定方法の提供。

【構成】 まず、水銀イオン還元酵素6.0nmoleをジアゾ結合により、85mgの多孔質ガラスに固定化し、これに多孔質ガラスを混合したものをカラムに充填し、この酵素カラム4を図1に示すフローシステムに組み込む。次にこのフローシステムの所定箇所にNADPHを20 $\mu$ M含む500mMトリス-硫酸緩衝液3、純水2および塩化第二水銀を含む4mMシスティン水溶液を流す。これら各溶液の混合溶液は酵素カラム4中を通過し、フローセル5に達する。該溶液がフローセル5に達したところで励起光6を照射し、該溶液に含まれるNADPHの示す蛍光7の光度を蛍光光度計で測定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPHおよびメルカブト化合物を添加し、固定化水銀イオン還元酵素に接触させることにより、該溶液中における2価の水銀イオン( $Hg^{++}$ )を金属水銀( $Hg^0$ )に還元すると共に、これと等モル量のNADPHをNADP<sup>+</sup>に酸化する反応を連続的に進行させ、カラム通過後の溶液におけるNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を測定することにより、サンプル溶液中の水銀イオン濃度を連続的に定量することを特徴とする微量水銀の連続測定方法。

【請求項2】 上記固定化酵素に、水銀イオン還元酵素とカタラーゼを共存させ上記反応を増幅させた場合の請求項1記載の微量水銀の連続測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、微量の水銀を連続的に定量することができる微量水銀の連続測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来より水銀の測定にはいくつかの方法が用いられてきたが、一般的に日本工業規格(JIS K0101およびK0102)で指定されているジチゾン法(比色法)および原子吸光法が広く用いられている。ジチゾン法とは、水銀とジチゾンとの反応により形成される水不溶性の錯体を有機溶媒によって抽出し、抽出液の490nmの吸光度を測定して分析するものである。一方、原子吸光法とは、水銀イオンを含む試料溶液に酸性下で塩化第一スズを加えて水銀イオンを還元し、この溶液をエアレーションすることにより生成する金属水銀を気化させ、253.7nmの原子吸光を測定して分析するものである。

【0003】 上記方法は総合的に他の方法より優れる点が多いため広く用いられてきたが、次のような問題点が残されているため、その改善が望まれていた。まずジチゾン法は、操作が煩雑である上サンプルの必要量が比較的多いため、連続システムには適さない。また、原子吸光法と比較して感度が低く、しかも銀や銅などの妨害成分が比較的多く誤差が生じやすいため、微量の水銀を測定する方法としては好ましくない。さらに、クロロホルムや塩酸ヒドロキシルアミンなどの有害薬品を使用するため危険が伴う。一方、原子吸光法は比較的多量のサンプルを必要とするバッチ式操作によるものなので、連続システムには適さない。また、塩化スズなどの有害薬品を使用するため危険が伴うことなどがあげられる。

【0004】 また、水銀の連続測定やオートサンプラー等を利用した自動測定も試みられているが [Morita, H. et al. (1990) Analytical Science 6, 91~, Ping, L. et al. (1990) Anal. Chem. 62, 85~]、測定系に気体の流れを利用するため、装置が大がかりなものになるという問題点があった。

【0005】 多くの国では現在も農薬など様々な用途に水銀を利用しておらず、これらに起因する水銀汚染は水、大気および作物などを通じて極微量ながら各国に影響を及ぼしている。例えば雨水には0.0002ppm、海水には0.0003ppm程度の水銀が含まれているといわれている。わが国においては廃水放出の際の規制値が0.005ppmに設定されているため、規制値程度の濃度の水銀であれば上記従来の方法でも測定することはできるが、水銀濃度のモニターとして利用するためには、感度や操作性の

10 点から充分なものであると言えなかった。そこで、極微量の水銀でさえも感度良く連続的に測定することができる方法の確立が求められていた。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上述の従来技術の問題点を解決し、極微量の水銀でさえも感度良く連続的に測定することができる微量水銀の連続測定方法を提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記目的20 を達成するため鋭意研究した結果、微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPHおよびメルカブト化合物を所定量添加し、この溶液を多孔質の担体に固定化した水銀イオン還元酵素と連続的に接触させ、接触後の溶液中におけるNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を測定することにより、サンプル溶液中の水銀イオン濃度を連続的に定量することができることを見い出し、本方法を発明することができた。

【0008】 すなわち、本発明は、水銀イオン還元酵素を固定化した多孔質の担体、例えば強度の高い多孔質ガ

30 ラスに水銀イオン還元酵素をジアゾ結合によって固定化したものをカラムに充填し、このカラムに、微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPH(ニコチンアミド-アデニジヌクレオチドリン酸)およびメルカブト化合物を所定量添加した溶液を通過することにより、該溶液中における2価の水銀イオン( $Hg^{++}$ )を水銀イオン還元酵素の触媒作用によって金属水銀( $Hg^0$ )に還元すると共に、これと等モル量のNADPHをNADP<sup>+</sup>に酸化する反応を連続的に進行させ、カラム通過後の溶液におけるNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を40 測定することにより、サンプル溶液中の水銀イオン濃度を連続的に定量することを特徴とする微量水銀の連続測定方法を提供するものである。

【0009】 また、本発明では、上記多孔質の担体に、水銀イオン還元酵素と共にカタラーゼを固定化することにより、測定感度をさらに向上させることができる。

【0010】 本発明で用いられる水銀イオン還元酵素の基質は、溶液中の遊離水銀イオン単独ではなく、そのメルカブチドであるため、本発明ではサンプル溶液にメルカブト化合物を添加している。また、本発明者等の実験により該酵素の活性は、システアミンを用いた場合が最

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPHおよびメルカブト化合物を添加し、固定化水銀イオン還元酵素に接触させることにより、該溶液中における2価の水銀イオン( $Hg^{2+}$ )を金属水銀( $Hg^0$ )に還元すると共に、これと等モル量のNADPHをNADP<sup>+</sup>に酸化する反応を連続的に進行させ、カラム通過後の溶液におけるNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を測定することにより、サンプル溶液中の水銀イオン濃度を連続的に定量することを特徴とする微量水銀の連続測定方法。

【請求項2】 上記固定化酵素に、水銀イオン還元酵素とカタラーゼを共存させ上記反応を増幅させた場合の請求項1記載の微量水銀の連続測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、微量の水銀を連続的に定量することができる微量水銀の連続測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来より水銀の測定にはいくつかの方法が用いられてきたが、一般的に日本工業規格(JIS K0101およびK0102)で指定されているジチゾン法(比色法)および原子吸光法が広く用いられている。ジチゾン法とは、水銀とジチゾンとの反応により形成される水不溶性の錯体を有機溶媒によって抽出し、抽出液の490nmの吸光度を測定して分析するものである。一方、原子吸光法とは、水銀イオンを含む試料溶液に酸性下で塩化第一スズを加えて水銀イオンを還元し、この溶液をエアレーションすることにより生成する金属水銀を気化させ、253.7nmの原子吸光を測定して分析するものである。

【0003】 上記方法は総合的に他の方法より優れる点が多いため広く用いられてきたが、次のような問題点が残されているため、その改善が望まれていた。まずジチゾン法は、操作が煩雑である上サンプルの必要量が比較的多いため、連続システムには適さない。また、原子吸光法と比較して感度が低く、しかも銀や銅などの妨害成分が比較的多く誤差が生じやすいため、微量の水銀を測定する方法としては好ましくない。さらに、クロロホルムや塩酸ヒドロキシルアミンなどの有害薬品を使用するため危険が伴う。一方、原子吸光法は比較的多量のサンプルを必要とするバッチ式操作によるものなので、連続システムには適さない。また、塩化スズなどの有害薬品を使用するため危険が伴うことなどがあげられる。

【0004】 また、水銀の連続測定やオートサンプラー等を利用した自動測定も試みられているが [Morita, H. et al. (1990) Analytical Science 6, 91 ~, Ping, L. et al. (1990) Anal. Chem. 62, 85~] 、測定系に気体の流れを利用するため、装置が大がかりなものになるという問題点があった。

【0005】 多くの国では現在も農薬など様々な用途に水銀を利用しておらず、これらに起因する水銀汚染は水、大気および作物などを通じて極微量ながら各国に影響を及ぼしている。例えば雨水には0.0002ppm、海水には0.0003ppm程度の水銀が含まれているといわれている。わが国においては廃水放出の際の規制値が0.005ppmに設定されているため、規制値程度の濃度の水銀であれば上記従来の方法でも測定することはできるが、水銀濃度のモニターとして利用するためには、感度や操作性の

10 点から充分なものであると言えなかった。そこで、極微量の水銀でさえも感度良く連続的に測定することができる方法の確立が求められていた。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上述の従来技術の問題点を解決し、極微量の水銀でさえも感度良く連続的に測定することができる微量水銀の連続測定方法を提供することを目的とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記目的を達成するため鋭意研究した結果、微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPHおよびメルカブト化合物を所定量添加し、この溶液を多孔質の担体に固定化した水銀イオン還元酵素と連続的に接触させ、接触後の溶液におけるNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を測定することにより、サンプル溶液中の水銀イオン濃度を連続的に定量することができることを見い出し、本方法を発明することができた。

【0008】 すなわち、本発明は、水銀イオン還元酵素を固定化した多孔質の担体、例えば強度の高い多孔質ガラスに水銀イオン還元酵素をジアゾ結合によって固定化したものを作成し、このカラムに、微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸)およびメルカブト化合物を所定量添加した溶液を通過することにより、該溶液における2価の水銀イオン( $Hg^{2+}$ )を水銀イオン還元酵素の触媒作用によって金属水銀( $Hg^0$ )に還元すると共に、これと等モル量のNADPHをNADP<sup>+</sup>に酸化する反応を連続的に進行させ、カラム通過後の溶液におけるNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を測定することにより、サンプル溶液中の水銀イオン濃度を連続的に定量することを特徴とする微量水銀の連続測定方法を提供するものである。

【0009】 また、本発明では、上記多孔質の担体に、水銀イオン還元酵素と共にカタラーゼを固定化することにより、測定感度をさらに向上させることができる。

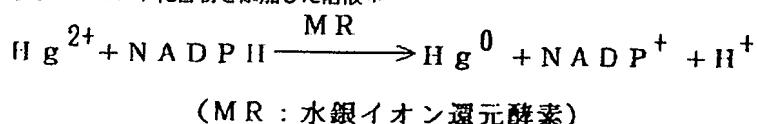
【0010】 本発明で用いられる水銀イオン還元酵素の基質は、溶液中の遊離水銀イオン単独ではなく、そのメルカブトであるため、本発明ではサンプル溶液にメルカブト化合物を添加している。また、本発明者等の実験により該酵素の活性は、システアミンを用いた場合が最

も高く、シテインがこれに次ぐことが確認された。なお、水銀イオン還元酵素の存在する菌体をスクリーニングする方法は [Appl. Environ. Microbiol. 54, 2871~2873. (1988)] で述べられている。

【0011】本発明におけるNADPHの減少量は、例えばNADPHの示す蛍光（励起波長 340nm、発光波長 470nm）を測定することにより分析できるが、他の好適な方法を用いても何等問題はない。また、本発明法により有機水銀の測定を行う場合には、サンプル溶液に既知の前処理を施せば良い。

【0012】

【作用】本発明では、微量の水銀を含有するサンプル溶液にNADPHおよびメルカブト化合物を添加した溶液\*



【0013】また、本発明においては、上記多孔質の担体に、水銀イオン還元酵素と共にカタラーゼを固定化することにより、測定感度がさらに向上する。これは、水銀イオン還元酵素の触媒により2価の水銀イオン（Hg<sup>2+</sup>）が金属水銀（Hg<sup>0</sup>）に還元され、生成した金属水銀が共存させたカタラーゼの触媒作用により再び酸化されて2価の水銀イオンにもどされる再生反応が起り、水銀イオンの酸化・還元が繰り返されるサイクリング反応系が確立されるためである。このサイクリング反応系では、1サイクルでサンプル溶液中に含まれる水銀イオンと当モル量のNADPHが減少し、当モル量のNADP<sup>+</sup>が生成される。したがって、このサイクリング反応においては単位時間当たりのNADPHの減少量およびNADP<sup>+</sup>の増加量は一定であり、これを時間経過と共に見るとNADPHは直線的に減少し、NADP<sup>+</sup>は直線的に増加するような反応が酵素カラム中で起こる。そのため、単位時間当たりのNADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量はカタラーゼが存在しない場合より大きくなり、より感度良く水銀を定量することができるものである。

【0014】上記サイクリング反応とは、酵素を用いる高感度測定法である酵素的サイクリング法 [Lowry, O. H. et. al. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2761~] と同質のものであり、測定すべき物質Aの反応系の他に物質Aの再生系を設け、繰り返し反応に関与させることで増幅を行わせるというものである。

【0015】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。しかし本発明の範囲は以下の実施例により制限されるものではない。

【0016】

【実施例】本発明の微量水銀の測定方法の一実施例を図1および図2を用いて説明する。本実施例では、図1に

\*を、水銀イオン還元酵素を固定化させた多孔質の担体を充填したカラムに通すことにより、該溶液と水銀イオン還元酵素とを連続的に接触させ、化1に示す反応を進行させている。この反応では、水銀イオン還元酵素の触媒作用により、サンプル溶液中に含まれている2価の水銀イオン（Hg<sup>2+</sup>）が金属水銀（Hg<sup>0</sup>）に還元され、それと同時に還元された水銀イオンと等モル量のNADPHがNADP<sup>+</sup>に酸化される。そのため、NADPHの減少量またはNADP<sup>+</sup>の増加量を測定することにより、水銀イオン含有量を定量することができるものである。

【化1】

示すフローシステムを用いて微量水銀の連続測定を行った。なお、上記フローシステムにおける酵素カラム4は、次のようにして作製した。水銀イオン還元酵素6.0nmole (0.35mg) を、85mgの多孔質ガラス（細孔径1600A、粒径 0.3~0.5mm、比表面積約50m<sup>2</sup>/g、米国特許3,843,341）に、ジアゾ結合[Mason, R. D. et al. (1972) Biotechnol. and Bioeng. 14, 637~]で固定化し、この固定化酵素に、85mgの多孔質ガラス、または7.2mgのカタラーゼを上記同様にジアゾ結合で固定化した同量の多孔質ガラスを混合し、内径3mm、長さ50mmのカラムに充填して作製した。

【0017】まず、NADPHを20μM含む500mMトリス-硫酸緩衝液3 (pH 7.5) を、ポンプ9によって0.2ml/minで流し、この流路と合流する流路に種々の濃度の塩化第二水銀（HgCl<sub>2</sub>）を含む4 mMシステアミン水溶液（サンプル溶液1）を、ポンプ9によって0.8ml/minで2~3分間流した。その際、バルブ8によってサンプル溶液1の流路に純水2を流し込むことにより、サンプル溶液1の濃度調整を行った。各流路が合流してできた混合溶液は酵素カラム4中を通過し、フローセル5に達する。該溶液がフローセル5に達したところで励起光6を照射し、該溶液に含まれるNADPHの示す蛍光7（励起波長 340nm、蛍光波長 470nm）の光度を島津分光蛍光度計RF-5000で測定した。

【0018】上記のようにして測定した蛍光光度からNADPHの減少量を求めたところ、NADPH濃度の減少量とサンプル溶液中の塩化第二水銀濃度との間に図2に示すような関係が得られた。図2からも分かるように、水銀イオン還元酵素にカタラーゼを添加せずに単独で固定化した場合は、塩化第二水銀とNADPHとがほぼ1:1のモル比で反応しているが、水銀イオン還元酵素にカタラーゼを添加して固定化した場合（酵素サイク

リング法)は、NADPHの反応する量が増大し、感度が向上した。また、カタラーゼを存在させた上記酵素サイクリング法においては、サンプルおよびNADPH溶液の流速を下げることにより、さらに感度が向上することが確認された。

【0019】なお本実施例では、水銀イオン還元酵素としてOrange A Matrex gel (Amicon社製)を使用し、これをアフィニティクロマトグラフィー法 [Fox, B. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, No.5, 2498~]によって精製したものを用いた。また、カタラーゼは、東京化成製 (beef liver由来)のものを用いた。

【0020】

【比較例1】塩化第二水銀を0.0.1. 0.2. 0.5. 0.7および1.0 $\mu$ M含有する溶液を用意し、従来の技術である原子吸光法および本発明の酵素サイクリング法により測定を行った。なお、原子吸光法については、上記溶液を0.5mlずつ200mlの三角フラスコに取り、日本工業規格 (JIS K0102)に規定された方法で前処理および測定を行い、酵素サイクリング法については、上記実施例と同様にして測定を行った。その結果、図3に示すように両測定値の間にはほとんど差がなく、精度良く定量されていた。

【0021】

【発明の効果】本発明の開発により、水銀イオン濃度の検出下限が、カタラーゼを存在させなかった場合0.2~0.3 $\mu$ M (40~60ppb Hg)、カタラーゼを存在させた場合では実に0.1 $\mu$ M (20ppb Hg)以下の超微量連続分析\*

\*が可能になった。また、本発明法は従来の方法のように、還元剤などとして重金属塩や塩酸ヒドロキシアミン等の有害物質を使用せずに測定することができるため、環境保全および安全面からみて非常に好ましいものである。さらに、本発明法における水銀イオン還元酵素は、高い基質特異性を有しているためHg<sup>2+</sup>のみに特異的に反応し、他のイオン毎の選択性も高いため他の物質による妨害が少い。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例で用いた本発明法におけるフローシステムの概念図である。

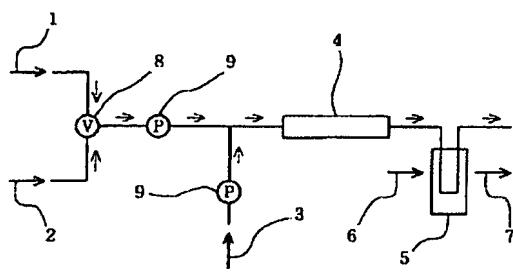
【図2】本発明の方法により微量水銀の測定を行った際のNADPH濃度の減少量とHgCl<sub>2</sub>濃度との関係を示すグラフである。

【図3】従来の微量水銀の測定法の一つである原子吸光法と、本発明の方法による微量水銀の測定値の相関を表すグラフである。

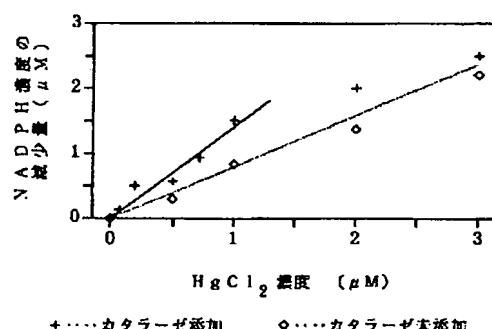
【符号の説明】

- 1 ……サンプル溶液
- 2 ……純水
- 3 ……NADPHを含むトリス-硫酸緩衝液
- 4 ……酵素カラム
- 5 ……フローセル
- 6 ……励起光
- 7 ……蛍光
- 8 ……バルブ
- 9 ……ポンプ

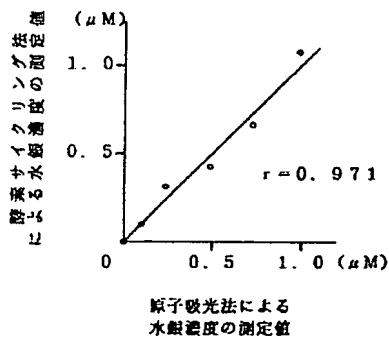
【図1】



【図2】



[図3]



## フロントページの続き

(72)発明者 沼田 雅彦  
東京都千代田区丸の内1丁目8番2号 同  
和鉛業株式会社内  
(72)発明者 宇尾 基弘  
東京都江戸川区清新町1-3-3-505

(72)発明者 牧島 亮男  
茨城県つくば市下広岡500-10  
(72)発明者 軽部 征夫  
神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 05-023198

(43) Date of publication of application : 02.02.1993

---

(51) Int.Cl. C12Q 1/26

C12Q 1/30

---

(21) Application number : 03-203212 (71) Applicant : DOWA

MINING CO

LTD

MAKISHIMA

SUKEO

KARUBE

MASAO

(22) Date of filing : 19.07.1991 (72) Inventor : NUMATA

MASAHIKO

UO

MOTOHIRO

MAKISHIMA

SUKEO

KARUBE

MASAO

---

(54) METHOD FOR CONTINUOUSLY MEASURING TRACE AMOUNT OF MERCURY

(57) Abstract:

PURPOSE: To continuously measure ultramicro mercury in high sensitivity and high precision by adding NADPH and a mercapto compound to a sample solution containing a trace amount of mercury, bringing the mixture into contact with an immobilized mercury ion reducing enzyme and measuring reduced amount etc., of NADPH, etc.

CONSTITUTION: A fixed mercury ion reducing enzyme obtained by immobilizing a mercury ion

reducing enzyme on a porous glass by diazo bond is packed into an enzyme column 4 and 500mM tris buffer solution (pH 7.5) containing NADPH and a mercapto compound is fed thereto by a pump 9 and a sample solution 1 containing a trace amount of mercury is mixed with a pure water 2 by a valve 8 and passed through an enzyme column 4 and bivalent mercury ion in the solution is reduced to a metallic mercury and simultaneously a reaction for oxidizing equimolar amount of NADPH to NADP + proceeds continuously and concentration change of the component after passing through the column is measured by measuring fluorescence 7 obtained by irradiating with excitation light. Thereby mercury ion concentration in the sample liquid 1 is continuously determined.

---

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.06.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of

application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3034654

[Date of registration] 18.02.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] By adding NADPH and a mercapto compound in the sample solution containing the mercury of a minute amount, and making a fixed mercury ion reductase contact while returning the divalent mercury ion in this solution ( $Hg^{2+}$ ) to metal mercury ( $Hg^0$ ) It is NADPH of this and an equimolecular amount NADP<sup>+</sup> The decrement or NADP<sup>+</sup> of NADPH By measuring augend [ in / the reaction which oxidizes is advanced continuously and / the solution after column passage ] The continuous measurement approach of the minute amount mercury characterized by carrying out the quantum of the mercury ion concentration in a sample solution continuously.

[Claim 2] The continuous measurement approach of the minute amount mercury according to claim 1 at the time of making a mercury ion reductase and a catalase live in the

above-mentioned immobilized enzyme together, and making it amplify the above-mentioned reaction.

---

#### DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the continuous measurement approach of the minute amount mercury which can carry out the quantum of the mercury of a minute amount continuously.

[0002]

[Description of the Prior Art] Although some approaches have been used for measurement of mercury from before, the dithizone method (colorimetric method) and atomic absorption method which are generally specified by Japanese Industrial Standards (JIS K0101 and K0102) are used widely. A dithizone method extracts the complex of the water-insoluble nature formed of the reaction of mercury and a dithizone with an organic solvent, and is an extract. The absorbance of 490nm is measured and analyzed. On the other hand, add a stannous chloride to the sample solution containing mercury ion under acidity, return mercury ion, the metal mercury generated by carrying out aeration of this solution is made to evaporate, and an atomic absorption method is 253.7nm. Atomic absorption is measured and analyzed.

[0003] Since the above-mentioned approach had many points of excelling other approaches synthetically, it had been used widely, but since the following troubles were left behind, the improvement was desired. Probably, since a dithizone method has comparatively many initial complements of an upper sample with complicated actuation, it is not suitable for a continuous system. Moreover, as compared with an atomic absorption method, sensibility is low, and since there are comparatively many active jamming components, such as silver and copper, and it

is moreover easy to produce an error, as an approach of measuring the mercury of a minute amount, it is not desirable. Furthermore, in order to use harmful chemicals, such as chloroform and hydroxylamine hydrochloride, risk follows. On the other hand, since atomic absorption method is based on the batch type actuation which needs comparatively a lot of samples, it is not suitable for a continuous system. Moreover, it is raised that risk follows etc. in order to use harmful chemicals, such as tin chloride.

[0004] Moreover, although the automatic measure using continuous measurement, an automatic sampler, etc. of mercury is also tried, in order to use gaseous flow for [Morita, H. et al. (1990) Analytical Science 6, 91 - Ping, L. et al. (1990) Anal. Chem. 62, 85-], and system of measurement, there was a trouble that equipment will become large-scale.

[0005] In many countries, current uses mercury for various applications, such as agricultural chemicals, and the mercury pollution resulting from these has affected each country with every [ultralow volume] through water, atmospheric air, crops, etc. In storm sewage In 0.0002 ppm and seawater It is said that about 0.0003 ppm mercury is contained. Since the regulation value in the case of waste water emission was set as 0.005 ppm in our country, when it was mercury of the concentration of regulation value extent, it could measure also by the above-mentioned conventional approach, but in order to use as a monitor of mercury concentration, it was not able to be said from the point of sensibility or operability that it was enough. Then, establishment of the approach of measuring even the mercury of ultralow volume with sufficient sensibility continuously was called for.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention solves the trouble of the above-mentioned conventional technique, and aims at offering the continuous measurement approach of the minute amount mercury which can measure even the mercury of ultralow volume with sufficient sensibility

continuously.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order that this invention person etc. may attain the above-mentioned purpose, as a result of inquiring wholeheartedly, specified quantity addition of NADPH and the mercapto compound is carried out at the sample solution containing the mercury of a minute amount. The decrement or NADP<sup>+</sup> of NADPH [ make the mercury ion reductase which fixed this solution in porous support contact continuously, and ] in the solution after contact By measuring augend It was able to find out that the quantum of the mercury ion concentration in a sample solution could be carried out continuously, and this approach was able to be invented.

[0008] Namely, the support of the porosity in which this invention fixed the mercury ion reductase, For example, a column is filled up with what fixed the mercury ion reductase by diazo association in porous glass with high reinforcement. By letting the solution which carried out specified quantity addition of NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) and the mercapto compound pass in the sample solution which contains the mercury of a minute amount in this column While returning the divalent mercury ion in this solution ( $Hg^{2+}$ ) to metal mercury ( $Hg^0$ ) by the catalysis of a mercury ion reductase It is NADPH of this and an equimolecular amount NADP<sup>+</sup> The decrement or NADP<sup>+</sup> of NADPH By measuring augend [ in / the reaction which oxidizes is advanced continuously and / the solution after column passage ] The continuous measurement approach of the minute amount mercury characterized by carrying out the quantum of the mercury ion concentration in a sample solution continuously is offered.

[0009] Moreover, in this invention, sensitometry can be further raised by fixing a catalase with a mercury ion reductase in the support of the above-mentioned porosity.

[0010] The substrate of the mercury ion reductase used by this invention is not free water complex ion independent [ in a solution ], and since it is the mercaptide, it has added the

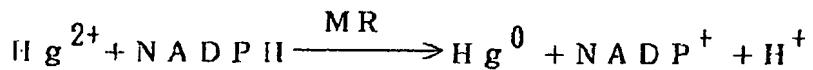
mercapto compound in the sample solution in this invention. Moreover, the case where cysteamine is used for the activity of this enzyme by this invention person's etc. experiment was the highest, and it was checked that a cysteine ranks second to this. In addition, the approach of screening the fungus body in which a mercury ion reductase exists is described by Appl. Environ. Microbial. 54, and [2871-2873] (1988).

[0011] Although the decrement of NADPH in this invention can be analyzed by measuring the fluorescence (excitation wavelength 340nm, luminescence wavelength 470nm) which NADPH shows, even if it uses other suitable approaches, it is satisfactory in any way. Moreover, what is necessary is just to perform known pretreatment to a sample solution, in measuring organomercury by this invention method.

[0012]

[Function] By letting it pass in the column which filled up with this invention the support of the porosity which made the sample solution containing the mercury of a minute amount fix a mercury ion reductase for the solution which added NADPH and a mercapto compound, this solution and a mercury ion reductase are contacted continuously, and the reaction which shows \*\* 1 is advanced. NADPH of the mercury ion and equimolecular amount which the divalent mercury ion ( $Hg^{2+}$ ) contained in the sample solution was returned to metal mercury ( $Hg^0$ ) by the catalysis of a mercury ion reductase, and were returned to it and coincidence at this reaction is  $NADP^+$ . It oxidizes. Therefore, the decrement or  $NADP^+$  of NADPH The quantum of the mercury ion content can be carried out by measuring augend.

[Formula 1]



(MR : 水銀イオン還元酵素)

[0013] Moreover, in this invention, sensitometry improves further by fixing a catalase with a mercury ion reductase in the support of the above-mentioned porosity. This is because

the cycling system of reaction by which divalent mercury ion ( $Hg^{2+}$ ) is returned to metal mercury ( $Hg^0$ ) by the catalyst of a mercury ion reductase, the regenerative reaction which oxidizes again by the catalysis of the catalase which the generated metal mercury made live together, and is returned to divalent mercury ion occurs, and oxidation and reduction of mercury ion are repeated is established. In this cycling system of reaction, NADPH of the mercury ion contained in a sample solution in 1 cycle and this molar quantity decreases, and it is  $NADP^+$  of this molar quantity. It is generated. Therefore, it sets for this cycling reaction and they are the decrement of NADPH per unit time amount, and  $NADP^+$ . If augend is fixed and this is seen with time amount progress, NADPH will decrease linearly, and it is  $NADP^+$ . A reaction which increases linearly occurs in an enzyme column. Therefore, the decrement or  $NADP^+$  of NADPH per unit time amount Augend can become larger than the case where a catalase does not exist, and can improve [ sensibility ] mercury more the quantum.

[0014] It is a thing of making it amplify by the above-mentioned cycling reaction being homogeneous as the enzyme-cycling method [Lowry, O.H.et.al.(1961) J.Biol.Chem.236, and 2761-] for using an enzyme which is a high sensitivity measuring method, preparing the reversion system of Matter A other than the system of reaction of the matter A which should be measured, and making it participate in a repeat reaction.

[0015] Hereafter, an example explains this invention in more detail. However, the range of this invention is not restricted by the following examples.

[0016]

[Example] One example of the measuring method of the minute amount mercury of this invention is explained using drawing 1 and drawing 2 . In this example, continuous measurement of minute amount mercury was performed using the flow system shown in drawing 1 . In addition, the enzyme column 4 in the above-mentioned flow system was produced as follows. mercury ion reductase 6.0nmole (0.35mg) -- 85mg porous glass (pole

diameter 1600A --) Particle size 0.3 - 0.5 mm and specific-surface-area [ of about 50m ] 2 / g, United States patent To 3,843,341 Diazo association [Mason, R.D. et al. (1972) Biotechnol. and Bioeng. 14, and 637 -] It fixes. this immobilized enzyme -- 85mg porous glass -- or -- The porous glass of the tales doses which fixed the 7.2mg catalase by diazo association like the above was mixed, and the column with a bore [ of 3mm ] and a die length of 50mm was filled up, and it produced.

[0017] 20microM First, NADPH is included. About the 500mM tris-sulfuric-acid buffer solution 3 (pH 7.5), it is by the pump 9. It is by the pump 9 about 4mM cysteamine water solution (sample solution 1) which contains the mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) of various concentration by 0.2 ml/min in a sink, this passage, and the joining passage. It passed for 2 - 3 minutes by 0.8 ml/min. Concentration adjustment of the sample solution 1 was performed by slushing pure water 2 into the passage of the sample solution 1 by the bulb 8 at that time. The mixed solution which was able to join and do each passage passes through the inside of an enzyme column 4, and reaches a flow cell 5. The excitation light 6 was irradiated in the place where this solution reached the flow cell 5, and the luminous intensity of the fluorescence 7 (excitation wavelength nm [ 340 ], fluorescence wavelength 470nm) which NADPH contained in this solution shows was measured by Shimazu spectrophotofluorometer RF-5000.

[0018] When the decrement of NADPH was calculated from the fluorescence luminous intensity measured as mentioned above, relation as shown in drawing 2 between the decrement of NADPH concentration and the mercuric chloride concentration in a sample solution was obtained. When it fixed independently, without adding a catalase to a mercury ion reductase so that drawing 2 may also show, mercuric chloride and NADPH had reacted by about 1:1 mole ratio, but when a catalase was added and fixed in a mercury ion reductase (the enzyme cycling method), the amount to which NADPH reacts increased and sensibility improved. Moreover, in the describing [ above ] enzyme cycling method in

which the catalase was made to exist, it was checked by lowering the rate of flow of a sample and a NADPH solution that sensibility improves further.

[0019] In addition, at this example, it is a mercury ion reductase. Orange A Matrix gel (product made from Amicon) was used, and what refined this by the affinity chromatography method [Fox, B. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, No. 5, and 2498-] was used. Moreover, the thing (beef liver origin) by Tokyo Chemicals was used for the catalase.

[0020]

[The example 1 of a comparison] mercuric chloride 0, 0.1, 0.2, 0.5, and 0.7 -- and -- The solution of which 1.0microM content is done was prepared, and it measured by the atomic absorption method which is a Prior art, and the enzyme cycling method of this invention. In addition, about an atomic absorption method, it is the above-mentioned solution. Every 0.5ml It takes to a 200ml Erlenmeyer flask, and is Japanese Industrial Standards. (JIS K0102) By the specified approach, pretreatment and measurement were performed and it measured like the above-mentioned example about the enzyme cycling method. Consequently, as shown in drawing 3, among both measured value, there is almost no difference and the quantum was improved by precision.

[0021]

[Effect of the Invention] When the minimum limit of detection of mercury ion concentration does not make a catalase exist by development of this invention By the case where 0.2 - 0.3microM (40 - 60ppb Hg) and a catalase are made to exist, it is . The super-minute amount continuous analysis below 0.1microM (20ppb Hg) became possible. Moreover, since this invention method can be measured like the conventional approach, without using harmful matter, such as a heavy-metal salt and a hydrochloric-acid hydroxy amine, as a reducing agent etc., it is very desirable, in view of environmental preservation and a safety aspect. Furthermore, since the mercury ion reductase in this invention method has high substrate specificity, it

reacts only to  $Hg^{2+}$  specifically, and since the selectivity for every ion of other is also high, there is little active jamming by others and the matter.

---

#### DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the conceptual diagram of the flow system in this invention method used in the example.

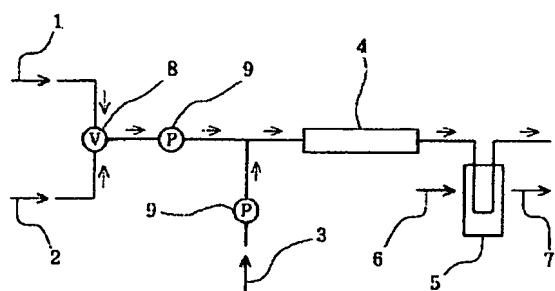
[Drawing 2] The decrement of the NADPH concentration at the time of measuring minute amount mercury by the approach of this invention, and  $HgCl_2$  It is the graph which shows relation with concentration.

[Drawing 3] It is a graph showing correlation of the measured value of the minute amount mercury by the atomic absorption method which is one of the measuring methods of conventional minute amount mercury, and the approach of this invention.

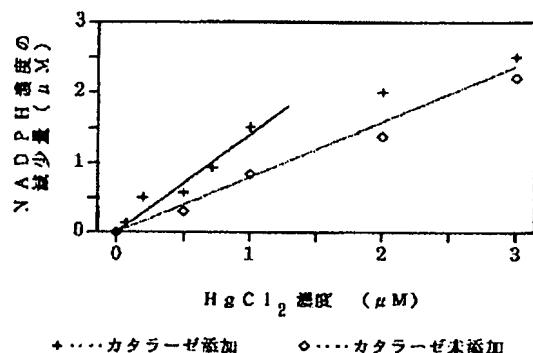
[Description of Notations]

- 1 ..... Sample solution
- 2 ..... Pure water
- 3 ..... The tris-sulfuric-acid buffer solution containing NADPH
- 4 ..... Enzyme column
- 5 ..... Flow cell
- 6 ..... Excitation light
- 7 ..... Fluorescence
- 8 ..... Bulb
- 9 ..... Pump

Drawing 1



Drawing 2



Drawing 3

